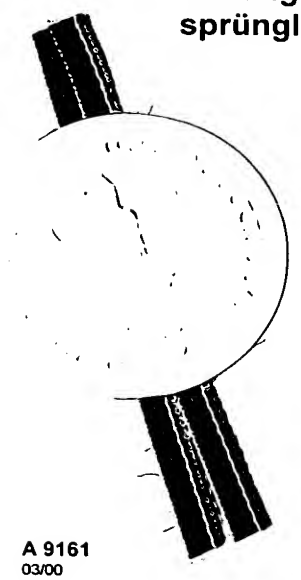
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:	102 47 896.1
Anmeldetag:	14. Oktober 2002
Anmelder/Inhaber:	Bruker Daltonik GmbH, Bremen/DE
Bezeichnung:	Mehrdimensionale Trennung von Biosubstanzgemischen für massenspektrometrische Analysen
IPC:	G 01 N 33/50

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.



München, den 13. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

A 9161
03/00
EDV-L

3

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Geräte für die zwei- oder mehrdimensionale Auftrennung von Biosubstanzgemischen, besonders von Proteingemischen, für die massenspektrometrische Analyse.

Die Erfindung besteht darin, die Trenneffekte, die bei der selektiven Bindung von Biosubstanzen aus Lösungen an festen Oberflächen mit geeigneten Bindungseigenschaften oder bei der fraktionsweisen Auflösung oberflächengebundener Biosubstanze durch besonders eingestellte Lösemittelgemische zu erzielen sind, für die Trennung in mehrere Fraktionen einzusetzen, und zwei oder mehrere Generationen solcher Trennvorgänge mit verschiedenen Trenndimensionen für die Trennung der jeweiligen Fraktionen in jeweils mehrere Unterfraktionen hintereinanderzuschalten. Diese Trennungen können ohne den Einsatz von Chromatographen allein auf Pipettierrobotern vorgenommen werden und benötigen weit weniger Zeit als eine mehrdimensionale Chromatographie oder Elektrophorese. Als reversibel oberfächenbindende Materialien sind praktisch alle für die Flüssigkeitschromatographie verwendeten festen Phasen, aber darüber hinaus auch selektiv bindende Schichten, beispielsweise Schichten mit Breitband-Antikörpern, und affine Belegungen allgemeinerer Art verwendbar. Die bindenden Oberflächen können Beschichtungen auf suspensierbaren Kügelchen sein, vorzugsweise magnetischen Kügelchen, aber auch Belegungen von Gefäßwänden, beispielsweise der Mikrogefäße in Mikrotiterplatten, oder fleckenweise Belegungen von Probenträgerplatten, beispielsweise von MALDI-Probenträgerplatten.

Figur 2

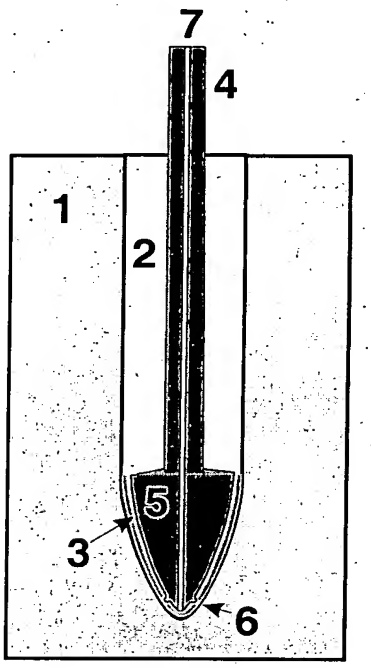


Abbildung 2

5

Mehrdimensionale Trennung von Biosubstanzgemischen für massenspektrometrische Analysen

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren und Geräte für die zwei- oder mehrdimensionale Auftrennung von Biosubstanzgemischen, besonders von Proteingemischen, für die massenspektrometrische Analyse.

[0002] Die Erfindung besteht darin, die Trenneffekte, die bei der selektiven Bindung von Biosubstanzen aus Lösungen an festen Oberflächen mit geeigneten Bindungseigenschaften oder bei der fraktionsweisen Auflösung oberflächengebundener Biosubstanzen durch besonders eingestellte Lösemittelgemische zu erzielen sind, für die Trennung in mehrere Fraktionen einzusetzen, und zwei oder mehrere Generationen solcher Trennvorgänge mit verschiedenen Trenndimensionen für die Trennung der jeweiligen Fraktionen in jeweils mehrere Unterfraktionen hintereinanderzuschalten. Diese Trennungen können ohne den Einsatz von Chromatographen allein auf Pipettierrobotern vollautomatisch vorgenommen werden und benötigen weit weniger Zeit als eine mehrdimensionale Chromatographie oder Elektrophorese. Als reversibel oberfächenbindende Materialien sind praktisch alle für die Flüssigkeitschromatographie verwendeten festen Phasen, aber darüber hinaus auch selektiv bindende Schichten, beispielsweise Schichten mit Breitband-Antikörpern, und affine Belegungen allgemeinerer Art verwendbar. Die bindenden Oberflächen können Beschichtungen auf suspensierbaren Kügelchen sein, vorzugsweise magnetischen Kügelchen, aber auch Belegungen von Gefäßwänden, beispielsweise der Mikrogefäße in Mikrotiterplatten, oder fleckenweise Belegungen von Probenträgerplatten, beispielsweise von MALDI-Probenträgerplatten.

Stand der Technik

[0003] In der Biochemie, der molekularen Biologie, der Zellforschung, der pharmakologischen Medikamentenentwicklung bis hin in die vorklinische und klinische medizinische Forschung wird die Analyse von komplexen Biosubstanzgemischen immer wichtiger. Die Biosubstanzgemische können Proteingemische sein, einschließlich aller Proteinkonjugate wie Glycoproteine oder Lipoproteine, aber auch andere Biosubstanzen wie beispielsweise DNA, Polysaccharide, Metabolite oder Regulationsstoffe wie etwa Cortico-Steroide. Im Falle der Proteine kann das Gemisch ein vollständiges Proteom sein, das alle Proteine eines Zellverbandes oder einer Körperflüssigkeit umfasst. Es aber kann sich auch um ein Teilproteom handeln, das durch eine beliebige Art einer Grobfraktionierung aus dem Proteom gewonnen wurde, beispielsweise mit einer Trennung durch Zentrifugieren oder durch breitbandige Affinitätsextraktion. Oder es kann sich um eine künstlich hergestellte Mischung handeln, beispielsweise um eine Mischung zweier an sich gleicher Teilproteome, deren Zellverbände aber verschiedenen Stresszuständen (Krankheit, Ernährung, Temperatur, Pharmaka) unterworfen

waren und deren Proteine verschieden markiert wurden, um sie in der massenspektrometrischen Analyse wieder ihrer Herkunft zuordnen zu können.

[0004] Das Ziel der Analyse kann eine einfache Identifizierung der Biosubstanzen des Gemischs sein, oder aber die Feststellung der relativen Häufigkeiten im Vergleich zu einem Standard, beispielsweise für diagnostische Zwecke. Im Falle der Proteine kann es sich um die Suche nach strukturell abweichenden Proteinen handeln, die beispielsweise durch mutative, posttranslationale oder regulatorische Veränderungen entstanden sind. Sehr häufig wird die differentielle Expressionsanalyse angewandt, die die Konzentrationen der gebildeten Proteine in Abhängigkeit von Stresssituationen untersucht.

[0005] Die massenspektrometrische Analyse verlangt immer eine vorhergehende Trennung der Biosubstanzen, beispielsweise mit chromatographischen oder elektrophoretischen Trennverfahren, damit ein klar interpretierbares Massenspektrum entsteht. Im Falle von Proteinen wird die Analyse manchmal nach einer Trennung an den unveränderten Proteinen durchgeführt, insbesondere, wenn es sich um kleinere Proteine im Bereich bis zu maximal etwa 50 Aminosäuren handelt. Enthält das Gemisch größere Proteine, so wird vorzugsweise der massenspektrometrischen Analyse ein enzymatischer Verdau der Proteine vorgeschaltet. Der Verdau kann im Prinzip vor oder nach der chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung vorgenommen werden. Auch andere Biosubstanzen können einer enzymatischen oder chemischen Spaltung unterworfen werden.

[0006] Die chromatographische oder elektrophoretische Auftrennung vor einem enzymatischen Verdau hat bei Proteinen einen unschätzbaren Vorteil: Es ist die Zusammengehörigkeit der Verdaupeptide zu einem Protein bekannt. Damit liefern allein die exakt vermessenen Massen der Verdaupeptide bereits ein Muster, mit dem in Proteinsequenzdatenbanken eine Identifizierung anhand eines virtuellen Verdaus der Datenbank-Proteine vorgenommen werden kann. Nur in Fällen der Mehrdeutigkeit dieser Suchergebnisse müssen Fragmentionenspektren aufgenommen und zur Bestätigung der Identifizierung herangezogen werden. Wird die Trennung nach dem enzymatischen Verdau vorgenommen, so ist immer eine Fragmentionenmessung notwendig, um das Verdaupeptid zu identifizieren. Die Trennung nach dem Verdau hat aber den großen Vorteil, dass standardisierte Analysenmethoden erarbeitet werden können, die praktisch unabhängig von der Art des Proteingemischs sind, die also auf Membranproteine genau so gut anwendbar sind wie auf Peptide der Körperflüssigkeit..

[0007] Komplexe Gemische von Proteinen, die man vor einem enzymatischen Verdau trennen möchte, werden heutzutage in der Regel durch 2D-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für gewöhnlich SDS-PAGE eingesetzt, das ist Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat als Solubilisierungsmittel für die Proteine. In einer Richtung werden die Proteine (noch ohne SDS) durch ihren isoelektrischen Punkt (ihre mittlere ionische Ladung bei der Dissoziierung der Proteine in wässriger Lösung) in einem fixierten pH-Gefälle getrennt, in der anderen Richtung (mit SDS) durch ihre größenbestimmte, elektrophoretische

Wanderungsgeschwindigkeit durch das Gel. Diese ist weitgehend der Masse der Proteinmoleküle proportional.

[0008] Für eine massenspektrometrische Analyse färbt man die Proteine im Gel an, stanzt die angefärbten Gelstückchen aus, verdaut die Proteine in den Gelstückchen durch Enzyme, in der Regel durch Trypsin, extrahiert die so entstandenen Verdaupeptide, und misst deren exakten Massen und deren Sequenz mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden. Für die Aufgabe des Ausstechens und Verdauens gibt es kommerziell vertriebene Roboterstationen.

[0009] Für die Analyse der Gemische von Verdaupeptiden haben sich massenspektrometrische Messmethoden mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization) oder durch Elektrosprühen (ESI = Electro Spray Ionization) als Standardverfahren etabliert. Meist werden dazu Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS = Time-Of-Flight Mass Spectrometer) verwendet, es können hier aber auch Ionenzyklotron-Resonanzspektrometer (FT-ICR = Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) oder Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer (kurz: Ionenfallen) eingesetzt werden. Alle drei Arten von Massenspektrometern erlauben insbesondere die Aufnahme von Fragmentionenspektren ausgewählter Primärionen, die zur eindeutigen Identifizierung der Proteine in Sequenzdatenbanken verwendet werden können oder aus denen die Sequenz des Aufbaus der Peptide aus den Aminosäuren ganz oder zumindest teilweise abgelesen werden kann.

[0010] Es hat sich dabei erwiesen, dass auch schlechte Auftrennungen noch zu guten Resultaten führen: Wenn in einem ausgestanzten Gelstückchen unaufgetrennt zwei, drei oder mehrere Proteine enthalten sind, deren Verdaupeptide sich vermischen, so lassen sich auch diese noch gut identifizieren, selbst wenn keine Fragmentionenspektren aufgenommen werden. Die Güte und die Eindeutigkeit der Identifizierung hängt dabei stark von der Genauigkeit der Massenbestimmung ab, die bei einigen der genannten Typen von Massenspektrometern heute extrem gut ist. Die Aufnahme von Fragmentionenspektren verbessert die Identifizierung nochmals dramatisch: so können auch Überlappungen von sechs bis acht Proteinen noch festgestellt und identifiziert werden. Dieses Verfahren ist im Prinzip nur durch den Substanzverbrauch bei der Aufnahme der vielen Fragmentionenspektren und durch die zunehmende Überlappung der Isotopengruppen einzelner Verdaupeptide begrenzt. Für die Aufnahme der geeigneten Fragmentionenspektren wird heute in ersten Ansätzen eine datenabhängige Rücksteuerung eingesetzt, um die substanzverbrauchenden Fragmentionenspektren nur von solchen Peptiden zu gewinnen, für deren Herkunft aus Proteinen noch keine sichere Erkenntnis besteht.

[0011] Die 2D-Gel-Elektrophorese ist aber schwierig zu handhaben und liefert auch in erfahrenen Laboratorien nicht immer reproduzierbare Ergebnisse. Sie dauert lange: in der Regel mehrere Tage. Es wird daher seit langem nach Verfahren gesucht, die die 2D-Gel-Elektrophorese ablösen können.

8

[0012] Ein viel benutztes Verfahren besteht darin, die Proteine des Gemischs vor einer Auftrennung enzymatisch zu verdauen, und die Verdaupeptide erst dann einer Separation zu unterwerfen. Dabei wird für gewöhnlich eine 2D-Chromatographie angewandt, bei der das nunmehr sehr komplexe Gemisch aus Tausenden von Verdaupeptiden zunächst einer Trennung durch Flüssigkeitschromatographie mit einem ersten Säulenmaterial in Hunderte von Fraktionen unterworfen wird, die einzelnen Fraktionen werden danach mit anderen Säulenmaterialien nochmals aufgetrennt und der Massenspektrometrie zugeführt. Die zweiten chromatographischen Trennungsläufe werden in der Regel in LC-MS-Kopplungen mit Ionisierung durch Elektrosprühen durchgeführt, wobei automatisch Fragmentionenspektren der einzelnen Peptide aufgenommen werden. Aus dem Wust von Peptid-Fragmentionenspektren werden datentechnisch die originalen Proteine anhand ihrer Zusammengehörigkeit in Protein-Sequenzdatenbanken wieder zusammengesetzt. Dieses Verfahren hat aber ebenfalls den Nachteil einer langen Dauer, da jeder der chromatographischen Trennläufe etwa eine halbe Stunde (oder sogar sehr viel länger) dauert. Ähnliches gilt für die Kopplung chromatographischer und kapillarelektrophoretischer Trennläufe.

[0013] Viele Arbeiten beschäftigen sich damit, diese Vielzahl an Verdaupeptiden zu reduzieren. Sie konzentrieren sich beispielsweise darauf, nur jeweils ein Verdaupeptid aus jedem originären Protein zurückzubehalten. Auf diese Arbeiten soll aber hier nicht weiter eingegangen werden.

[0014] Es gibt aber auch einen grundsätzlich anderen Ansatz zur Trennung von Proteingemischen, der aber bisher kaum Eingang in die massenspektrometrische Analyse gefunden hat. Es ist die Auftrennung über selektive Bindungen, wie sie besonders in den vielfältigen Assays unter Benutzung von Array-Chips verwendet wird. In den einzelnen Feldern der Array-Chips werden dabei Schichten aufgetragen, die wie etwa Antikörper- oder DNA-Schichten, einzelne Proteine selektiv binden können. Bei der Herstellung von Array-Chips bemüht man sich, möglichst so stark selektive Schichten zu erzeugen, dass nur ein einziges Protein gebunden wird. Das gelingt jedoch nicht immer, da alle Schichten mehr oder weniger auch andere Proteine binden. Es ist daher festzustellen, dass es zwischen solchen Schichten, die praktisch alle Proteine binden, und solchen, die nur eine einzige Art von Protein binden, eine große Palette an mehr oder weniger breitbandig selektiven Schichten gibt, die bisher kaum für eine Trennung ausgenutzt wurden.

Aufgabe der Erfindung

[0015] Es ist die Aufgabe der Erfindung, eine schnelle, mehrdimensionale Auftrennung der Substanzen eines Biosubstanzgemischs, vorzugsweise eines Proteingemischs, zu ermöglichen und die dafür benötigten Geräte und Chemikalien in einfach handhabbaren Zusammenstellungen bereitzustellen. Die Auftrennung soll automatisierbar und in wenigen Stunden durchführbar sein.

9

Zusammenfassung der Erfindung

[0016] Die Erfindung besteht darin, die Trenneffekte, die bei der fraktionsweisen Bindung von Proteinen aus Lösungen an festen Oberflächen mit geeigneten Bindungseigenschaften oder bei der fraktionsweisen Lösung gebundener Proteine von Oberflächen durch besonders eingestellte Lösemittelgemische zu erzielen sind, für die Trennung in mehrere Fraktionen einzusetzen, und zwei oder mehrere Generationen solcher Trennvorgänge in mehreren Trenndimensionen für die Trennung der jeweiligen Fraktionen in jeweils mehrere Unterfraktionen hintereinanderzuschalten. Diese Trennungen beruhen auf jeweiligen stationären Gleichgewichten zwischen der Bindung der Biosubstanzen an bindefähigen Oberflächen und ihrer Lösung in einem Lösemittel. Sie können ohne den Einsatz von Chromatographen allein auf Pipettierrobotern vorgenommen werden und benötigen viel weniger Zeit als eine mehrdimensionale Chromatographie oder Elektrophorese. Als reversibel oberfächenbindende Materialien sind praktisch alle für die Flüssigkeitschromatographie verwendeten festen Phasen, aber darüber hinaus auch selektiv bindende Schichten, beispielsweise Schichten mit Antikörpern, und affine Belegungen allgemeinerer Art verwendbar. Die bindenden Oberflächen können Beschichtungen auf suspensierbaren Kügelchen sein, vorzugsweise magnetischen Kügelchen, aber auch Belegungen von Gefäßwänden, beispielsweise der Mikrogefäße in Mikrotiterplatten, oder fleckenweise Belegungen von Probenträgerplatten sein, beispielsweise von MALDI-Probenträgerplatten.

[0017] Es sind somit Schritte mit lösemittelabhängig fraktionierendem Ablösen der oberflächengebundenen Proteine mit Schritten selektiver Oberflächenbindung aus Lösungen mischbar, doch ist die Mischung dieser verschiedenen Verfahren keine notwendige Voraussetzung für die Erfindung.

[0018] Im Gegensatz zur dynamischen Trennung von Substanzgemischen in Chromatographen mit mobilen flüssigen Phasen, die Trennvermögen von vielen Hundert oder sogar Tausend theoretischen Böden aufweisen, handelt es sich bei dem fraktionierenden Ablösen um die Ausnutzung stationärer Lösungsgleichgewichte, die nur einige Zig theoretische Böden Trennvermögen haben. Durch das fraktionierende Lösen mit stufenweise veränderten Lösemitteln, beispielsweise durch Lösungen mit steigenden Konzentrationen an Salzen für Bindungen an Ionenaustauschern, oder durch steigende Konzentrationen von organischen Lösemitteln in wässriger Lösung für Bindungen an Umkehrphasen, lassen sich jeweils mehrere Fraktionen gewinnen. Durch ein mehrfaches Auswaschen einer gebundenen Fraktion von Proteinen mit frischem Lösemittel gleicher Konzentration lässt sich die Trennleistung verbessern. Für diese Art der Trennung werden die in der Chromatographie üblicherweise eingesetzten festen Phasen verwendet. Die physikalischen Dimensionen der Trennung können die Molekülgröße betreffen, wie in der „Size Exclusion Chromatography", oder die Ladungsdissoziation der Moleküle in Lösung, wie in der Ionenaustauscher-Chromatographie, oder die Hydrophobie der Moleküle, wie in der Umkehrphasen-Chromatographie.

[0019] Hinzu kann die Verwendung von selektiv bindenden Oberflächen kommen, die gerade wegen ihrer mehr oder weniger starken Selektivität noch wenig chromatographisch eingesetzt werden. Im Grenzfall kann ein oberflächengebundener Antikörper ein einzige Art von Proteinmolekülen aus der betreffenden Fraktion herausfischen, doch stehen hier die breitbandselektiven Oberflächen im Vordergrund. Die physikalische Dimension der Trennung wird durch Oberflächeneigenschaften der Moleküle im Allgemeinen bestimmt, im Besonderen kann beispielsweise eine Trennung nach Oberflächenmotiven der Moleküle erzielt werden, beispielsweise der Anordnung bestimmter Aminosäuren zueinander an der Oberfläche der gefalteten Proteine, oder auch nur eine kurze Reihenfolge von Aminosäuren bei einem ungefalteten Peptid. Eine in einem vorhergehenden Schritt gewonnene Fraktion mit Proteinen ist dann mehreren selektiv bindenden Oberflächen nacheinander zuzuführen, wobei jeweils ein Teil der Proteine selektiv gebunden wird. Auch die Restlösung der Fraktion nach Herausnahme aller an den verwendeten Schichten selektiv gebundenen Proteine kann noch einen Teil der Proteine enthalten, die für die weitere Analyse bereitstehen. Die selektiv gebundenen Proteine lassen sich wiederum entweder gemeinsam auflösen, oder aber, beispielsweise durch steigende Anteile an organischen Lösemitteln in wässriger Lösung, auch wieder fraktionierend.

[0020] Es können dann in weiteren Trenndimensionen weitere Fraktionierungen folgen. Es entsteht so als Endprodukt eine mehrdimensionale Matrix verschiedener Fraktionen, bei der jeweils die Komplexität der Mischung gegenüber dem ursprünglichen Gemisch soweit herabgesetzt ist, dass die Fraktionen problemlos massenspektrometrisch analysiert werden können.

[0021] Vor oder nach einer beliebigen Trenndimension kann dabei ein enzymatischer Verdau der getrennten Proteine eingeschaltet werden. Der Verdau kann in freier Lösung, aber auch affin gebunden durchgeführt werden. Dem Verdau muss in der Regel nochmals ein Waschen der Verdaupeptide nachgeschaltet werden, das Waschen kann aber auch mit der Probenpräparation auf einem MALDI-Probenträger gekoppelt werden.

[0022] Die bindenden Schichten können an Gefäßwänden oder Oberflächenflecken angebunden sein, sie können aber auch Schichten auf kleinen Partikelchen bilden. Die Partikelchen können einerseits kleine, suspensierte Kügelchen oder Kleinpartikel anderer Form (im Bereich von 50 Nanometer bis 100 Mikrometer Durchmesser) mit entsprechender Oberflächenbelegung, vorzugsweise einer porösen Oberflächenbelegung, sein. Die Kügelchen können einen magnetischen Kern besitzen, um sie durch bekannte Einrichtungen an Gefäßwänden zu halten oder periodisch durch Waschflüssigkeiten zu ziehen. Es kann sich bei den Partikelchen andererseits aber auch um größere Teilchen (mit Volumen von etwa 0,01 bis 1 Kubikmillimeter) aus offenporigem Festschaum oder frittenförmig zusammengebackenen Kleinpartikeln handeln. Sowohl die Festschäume wie auch die Kügelchen können als frei herumschwimmende Teilchen in Flüssigkeiten (beispielsweise als Suspensionen), wie auch oberflächengebunden verwendet werden.

[0023] Die Schritte des Verfahrens werden bevorzugt auf Pipettier- oder Dispensierrobotern durchgeführt. Sie können beispielsweise in Mikrotiterplatten ablaufen und die getrennten Proteine können in einem letzten Schritt auf MALDI-Probenträgerplatten aufpräpariert werden. Die dabei verwendeten Mikrotiterplatten können vorgefertigt alle verwendeten Partikelsuspensionen, Wandbelegungen, Waschflüssigkeiten, Lösungen mit eingestellten Salzgehalten, Enzyme, Pufferlösungen zur Aktivierung der Enzyme, Proben mit Massenreferenzen und Matrixlösungen für die Präparation der Proben für die Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption enthalten. Die Lösungen mit steigenden Gehalten an organischen Lösungsmitteln, beispielsweise Methanol oder Acetonitril, können vom Pipettierroboter selbst hergestellt werden. Die Mikrotiterplatten können, gegebenenfalls zusammen mit anderen Verbrauchsmaterialien wie beispielsweise den Pipettenspitzen, in gebrauchsfertigen Verbrauchspackungen in den Handel kommen.

[0024] Das erfindungsgemäße Verfahren kann selbstredend auch mit anderen, beispielsweise chromatographischen oder elektrophoretischen, Trennvorgängen gekoppelt werden, die dem erfindungsgemäßen Verfahren vorhergehen oder nachfolgen.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0025] Abbildung 1 zeigt einen Querschnitt durch eine Mikrotiterplatte (1) mit acht Mikrogefäßen (2), die jeweils im unteren, konischen Teil eine Wandbelegung (3) mit einem geeigneten oberflächlich bindenden Material haben.

[0026] Abbildung 2 zeigt eines dieser Mikrogefäße (2) mit einer eingeführten Pipettenspitze (4, 5, 6, 7) eines Pipettierroboters. Die auswechselbare Pipettenspitze hat einen Schaft (4) mit Kanüle (7) und eine besonders geformte Konusspitze (5), die in den Konus des Mikrogefäßes so eingepasst ist, dass nur ein schmaler Spalt zwischen Wandbelegung (3) und Konusspitze (5) bleibt. Durch mehrere Ansaug- und Ausstoßvorgänge kann die Flüssigkeit in der Pipettenspitze in guten Kontakt mit der Wandbelegung (3) gebracht werden, damit Wasch-, selektive Bindungs- und selektive Lösungsvorgänge besonders effektiv ablaufen können. Die Konusspitze hat kleine Noppen (6) die sich an die Wand anlegen und die Konusspitze so justieren, dass selbst kleinste Flüssigkeitsmengen aus den Mikrogefäßen wieder abgesaugt werden können.

Besonders günstige Ausführungsformen

[0027] Die Erfindung besteht darin, eine erste diskrete n-fache Fraktionierung der Substanzgemischprobe vorzunehmen und jede (oder auch nur einige) der n Fraktionen mindestens einer zweiten diskreten m-fachen Fraktionierung einer anderen Trenndimension zu unterwerfen. Die $n \times m$-fach (oder auch weniger) fraktionierten Proben werden, wahlweise unter Vor- oder Nachschalten weiterer Fraktionierungen durch andere Trennverfahren oder eines enzymatischen Verdaus, massenspektrometrisch untersucht, wobei vorzugsweise Massenspektrometer mit Einrichtungen zur Messung von Fragmentionenspektren verwendet werden.

12

[0028] Ein bevorzugtes Verfahren verwendet einen Pipettierroboter und vorgefertigte, mit aufgeklebten Folien versiegelte Mikrotiterplatten, die die benötigten Wandbelegungen oder Partikelsuspensionen, Waschflüssigkeiten, Extraktionsflüssigkeiten mit eingestellten Salzgehalten, Enzyme, Pufferlösungen zur Aktivierung der Enzyme und Matrixlösungen für die Präparation der Proben für die Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption enthalten. Die Verschlussfolien können von Pipettenspitzen durchstochen oder vor Gebrauch abgezogen werden. Die wässrigen Lösungen mit steigenden Gehalten an organischen Lösungsmitteln, beispielsweise Acetonitril, können vom Pipettierroboter selbst hergestellt werden. Der Pipettierroboter kann ebenfalls die für MALDI-Präparationen der getrennten Proteine auf entsprechenden Probenträgerplatten notwendigen Schritte vornehmen, wobei die Probenträgerplatten bevorzugt ebenfalls die Größe von Mikrotiterplatten haben.

[0029] Unter Verwendung von Mikrotiterplatten kann ein erfindungsgemäßes Verfahren für ein als Beispiel gewähltes Proteingemisch aus folgenden Schritten bestehen, wobei dem erfindungsgemäßen Verfahren mit zwei Trenndimensionen hier als Beispiel eine erste Trenndimension durch Size-Exclusion vorgeschaltet ist. Die Size-Exclusion-Chromatographie ist hier nicht Teil des erfindungsgemäßen Verfahrens, weil sie keine Bindung an Oberflächen beinhaltet. Das kombinierte Verfahren hat somit drei Trenndimensionen, die beiden letzten gehören zum erfindungsgemäßen Verfahren:

[0030] Das kombinierte Verfahren nimmt in Schritt (1) eine Trennung des Proteingemischs nach Größe der Moleküle auf einer Size-Exclusion-Mikrosäule in acht Fraktionen vor. Diese Trennung auf einer Mikrosäule kann leicht auf einem Pipettierroboter implementiert werden. (2) Die so gewonnenen acht Fraktionen der ersten Dimension des kombinierten Verfahrens werden in acht Mikrogefäße gegeben, deren Wandoberflächen mit Ionenaustauschermaterial belegt sind, und die Proteine werden dort ionisch gebunden. (3) Die in den Ionenaustauschern gebundenen Proteingemische werden mehrfach mit einer Waschflüssigkeit gewaschen, die die Proteine nicht löst. (4) Die Proteine werden in der ersten Trenndimension des erfindungsgemäßen Verfahrens (also in der zweiten Dimension des kombinierten Verfahrens) in sechs Stufen in wässerigen Salzlösungen steigender Konzentrationen (beispielsweise Ammoniumchlorid) ausgelöst und die jeweils sechs, also insgesamt 48 Fraktionen werden jetzt in Mikrogefäße gegeben, die mit affinitätssorbierenden Umkehrphasen belegt sind, wobei die Proteine dort affin gebunden werden. Es sind jetzt die Proteine in den 48 Fraktionen grob nach Molekülgröße und Molekülladung sortiert, eine Sortierung, wie sie grundsätzlich auch der 2D-Gelelektrophorese zugrunde liegt. (5) Die Proteine aller 48 Fraktionen werden jeweils mit Waschflüssigkeiten gewaschen, um sie vom Salz zu befreien, wobei die Flüssigkeiten so gewählt sind, dass sie keine Proteine lösen. (6) Die Proteine werden in der zweiten Trenndimension des erfindungsgemäßen Verfahrens (der dritten Trenndimension des kombinierten Verfahrens) in jeweils acht Stufen in Lösungsgemischen gelöst, die steigende Anteile an organischen Lösungsmitteln (beispielsweise mit Acetonitril) in wässeriger Lösung enthalten. Dabei werden die Proteine nach ihrer Hydrophobie getrennt, wie dieses in der Umkehrphasen-Chromatographie geschieht. (7) Die nunmehr 384 Fraktionen werden auf eine MALDI-Probenträgerplatte aufgetragen, die bereits mit einer Matrix-Dünnschicht belegt ist. Diese Dünnschicht bindet die Proteine affin. (8) Die Probenträgerplatte wird in üblicher Weise der massenspektrometrischen Untersuchung in einem Fugzeitmassenspektrometer zugeführt, wobei wahlweise auf der Probenträgerplatte auch ein Waschschritt zwischengeschaltet sein kann.

[0031] Dieses Verfahren kann sehr leicht auf einem Pipettierroboter implementiert und automatisiert werden. Günstig ist dabei ein Pipettierroboter mit acht Pipettennadeln, da dann jeweils acht Trenn- und Waschvorgänge parallel ablaufen können. Die Automatisierung ist hier viel leichter durchzuführen als mit anderen Arten von Trennverfahren.

[0032] Natürlich ist es auch möglich, das Verfahren so einzuengen, dass nur die Fraktion der leichten Peptide aus der Size-Exclusion-Chromatographie den nachfolgenden Schritten des erfindungsgemäßen Verfahrens unterworfen wird. Diese bedürfen dann zu ihrer Analyse keines enzymatischen Verdaus. Es kann aber auch dem Schritt (6) ein enzymatischer Verdau, beispielsweise durch Trypsin, folgen. Dabei können alle Proteine dem Verdau unterworfen werden, oder auch nur die größeren Moleküle, die ja bereits in Schritt (1) von den kleineren Peptiden getrennt wurden.

[0033] Es wird für die Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zweckmäßigerweise eine Mikrotiterplatte mit 96 Mikrogefäßen verwendet, von denen acht an den Innenwänden mit Ionenaustauschern belegt sind, und 48 mit Umkehrphasen. Die Mikrogefäße können mit einer durchstechbaren Folie verschlossen sein. Sowohl Ionenaustauschermaterialien wie auch Umkehrphasen können in den jeweiligen Mikrogefäßen gleich sein, können aber auch auf die vorhergehende Trennung nach Molekülgrößen abgestimmt sein. Die restlichen Mikrogefäße dieser wie auch weiterer Mikrotiterplatten können Waschflüssigkeiten, Auslöseflüssigkeiten, Enzyme, Aktivierungspuffer für die Enzyme und dergleichen mehr enthalten. Es kann bevorzugt ein Pipettierroboter mit acht Pipettiernadeln verwendet werden. Das Verfahren kann dann (außer dem tryptischen Verdau) in etwa zwei Stunden durchgeführt werden.

[0034] Die wandbelegten Mikrogefäße können dabei eine besondere, unten konische Form haben, die auf Formen von austauschbaren Pipettierspitzen abgestimmt sind, wie in Abbildung 2 gezeigt. Die aufeinander abgestimmten Formen dienen dazu, die Wasch- oder Eluierungsflüssigkeiten gut in Strömungskontakt mit den Wandbelegungen zu bringen, wobei ein mehrfaches Ansaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit einen besonders guten Wasch- oder Löseeffekt ergibt. Noppen an der Pipettierspitze verhindern ein vollständiges Anliegen an der Wand. Die Pipettierspitze dieser Form kann die Flüssigkeit auch praktisch vollständig wieder entfernen.

[0035] Eine andere Ausführungsform der Erfindung bedient sich nicht der Wandbelegungen in den Mikrogefäßen, sondern verwendet Suspensionen mit winzigen Partikelchen mit Oberflächenbelegungen, wie sie ebenfalls bereits im Handel sind, vorzugsweise Magnetkügelchen. Die Magnetkügelchen können Durchmesser von 50 Nanometer bis etwa 10 Mikrometer haben. Dazu werden besondere Einrichtungen auf den Pipettierrobotern aufgebracht, die über versetzbare Magnete erlauben, die Kügelchen durch die Flüssigkeit mehrfach langsam hin- und herzuziehen oder zum Entfernen der Flüssigkeit an der Wand festzuhalten.

[0036] Die Partikelchen können aber auch – statt als Suspension verwendet zu werden – auf einer flachen Oberfläche in stark hydrophober Umgebung flächig aufgebracht sein. Dabei können auch Partikelchen mit größeren Durchmessern und Partikelchen ohne Magnetisierbarkeit verwendet werden. Sie können beispielsweise aufgeklebt sein. Die Wasch- und Löseflüssigkeiten werden dabei einfach als Tröpfchen aufpipettiert oder mit Piezo-Dispensern aufdispensiert.

[0037] Unter „Partikelchen" werden hier ganz allgemein Materialien mit großer aktiver, äußerer oder innerer Oberfläche verstanden. Das können einerseits kleine, suspensierte Kügelchen oder Kleinpartikel anderer Form (im Bereich von 5 bis 100 Mikrometer Durchmesser) mit entsprechend aktivierter Oberflächenbelegung, vorzugsweise einer porösen Oberflächenbelegung sein. Die Kügelchen können einen magnetischen Kern besitzen, um sie durch bekannte Einrichtungen an Gefäßwänden zu halten oder durch Waschflüssigkeiten zu ziehen. Es kann sich bei den Partikelchen andererseits aber auch um größere Teilchen (mit Volumen von etwa

0,01 bis 1 Kubikmillimeter) aus offenporigem Festschaum oder frittenförmig zusammengebackenen Kleinpartikeln handeln. Sowohl die Festschäume wie auch die Kügelchen können als frei herumschwimmende Teilchen in Flüssigkeiten (beispielsweise als Suspensionen), wie auch oberflächengebunden, wie auch eingeschlossen in Mikrosäulen oder Pipettenspitzen verwendet werden.

[0038] Für die Aufreinigung von Peptid-, Protein- oder DNA-Mischungen haben sich bisher besonders schwammartige Mikrokügelchen aus Umkehrphasen-Material (Poros©, ABI Bio-Systems), mit schwammartigen Umkehrphasenmaterial gefüllte Pipettenspitzen (ZipTips©, Millipore) oder magnetisierbare Kügelchen mit C18-Belegung bewährt. Diese Materialien binden Peptide oder Oligonukleotide über hydrophobe Bindungen. Die Biomoleküle lassen sich in der Regel durch wässrige Methanol- oder Acetonitril-Lösungen eluieren; die Eluierung stufenweise mit jeweils veränderten Anteilen an organischen Lösemitteln oder auch stufenweise durch jeweilige Änderung des pH-Wertes vorgenommen werden. Alle diese Materialien lassen sich auch im Rahmen der erfindungsgemäße Trennung von Substanzen verwenden.

[0039] Das Trennvermögen von Lösungsgleichgewichten ist nur moderat, kann aber durch mehrere Lösungsvorgänge mit frischem Lösungsmittel gleicher (oder sogar etwas schwächerer) Konzentration verstärkt werden. Aus Ionenaustauschern werden also die Proteine mehrfach mit der gleichen Salzkonzentration (oder mit Salzlösungen ganz leicht abnehmender Konzentration) ausgelöst, um alle bei dieser Konzentration austauschbaren Proteine auszuwaschen. Aus Umkehrphasen werden die Proteine mehrfach mit der gleichen wässrigen Lösung von Acetonitril ausgewaschen. Es ergibt sich so eine schärfere Trennung der Proteine.

[0040] Unter Verwendung der in Abbildung 2 gezeigten Pipettenspitzen kann ein Auswaschen von Proteinen mit einer Lösung eingestellter Konzentration auch dynamisch vorgenommen werden. Dabei wird die Lösung zunächst einfach in das Mikrogefäß gegeben, das in der Wandbelegung die Proteine trägt, wobei die Pipettenspitze nicht in die Flüssigkeit ragt. Dabei wird nur ein sehr geringer Teil der Proteine in Lösung gehen. Dann wird die Pipettenspitze abgesenkt, die praktisch noch saubere Lösung befindet sich jetzt größtenteils oberhalb der Wandbelegung. Nunmehr wird die Lösung sehr langsam angesaugt, wobei ein guter Wandkontakt zur Belegung hergestellt wird. Es wird so dynamisch mit stets sauberer Lösung ausgewaschen, wobei eine sehr gute Trennauflösung der einzelnen Fraktionen erzielt wird.

[0041] Hat ein Trennverfahren eine Auflösung von etwa 40 theoretischen Böden, was mit diesen Trennverfahren durchaus erzielt werden kann, so werden bei einer Fraktionierung in acht Fraktionen 80 % der Proteine sauber in nur einer Fraktion zu finden sein. Nur 20 % der Proteine entfallen auf zwei benachbarte Fraktionen, mit durchaus sehr unterschiedlichen Verhältnissen der Aufteilung. Bei zwei Generationen der Trennung gleicher Trennschärfe hintereinandergeschaltet und jeweils acht Fraktionen fallen 64 % der Proteine sauber in nur eine Fraktion, 32 % sind auf jeweils zwei Fraktionen verteilt, und 4 % erstrecken sich über vier Fraktionen. Bei drei Generationen der Trennung sind rund 50 % der Proteine in jeweils

16

nur einer der nunmehr 512 Fraktionen zu finden, etwa 37 % überdecken zwei Fraktionen, etwa 12 % verteilen sich auf jeweils vier Fraktionen, und weniger als ein Prozent der Proteine verteilt sich auf acht Fraktionen, im ungünstigsten Fall gleichmäßig verteilt; in günstigeren Fällen wird eine dieser Fraktionen den Hauptteil des Proteins enthalten. Diese Zahlen spiegeln das große Trennpotential der Erfindung wieder.

[0042] Häufig sind nicht alle Proteine zu untersuchen, sondern es richtet sich das Ziel nur auf die Analyse einer Untermenge von Proteinen. Ein Beispiel ist das Studium der relativen Expressionsstärke bestimmter Eiweiße in gestresstem und ungestresstem Gewebe. Ist diese Untermenge klein, so braucht die Trennung nicht unbedingt in allen Verästelungen durchgeführt zu werden. Außerdem ist es dann möglich, durch Verschiebung der Trenngrenzen zu erreichen, dass die gesuchten Proteine jeweils nur in einer Fraktion zu finden sind.

[0043] Die beiden günstigsten und bisher am weitesten untersuchten Trenndimensionen für dieses Verfahren sind die Molekularladung, gemessen durch Ionenaustauscher, und molekulare Hydrophobie, gemessen durch Umkehrphasen. Die Trennung durch Affinitäten anderer Art sind bisher weniger untersucht, bieten aber ein großes Potential.

[0044] Eine Trennung durch Ionenaustauscher wird durch die Extraktion der gebundenen Proteine mit Salzlösungen in stufenweise steigender Konzentration durchgeführt, wobei für eine spätere MALDI-Analyse ein alkalifreies Salz genommen werden sollte. Es hat sich dafür Ammoniumchlorid (NH_4Cl) sehr gut bewährt. Die Konzentrationsstufen werden vorzugsweise so gewählt, dass für das vorliegende analytische Problem eine Trennung in möglichst gleich viele Proteine in den einzelnen Trennstufen erzielt wird. Die Salzkonzentrationen können in Kalibrationsexperimenten ermittelt werden. Mehrfaches Auswaschen mit gleicher Konzentration erhöht die Tennschärfe. Die getrennten Proteine in den Salzlösungen werden dann Mikrogefäßen mit Umkehrphasen zugegeben und dort an den Umkehrphasen affin gebunden. Dadurch können auch größere Mengen an Salzlösungen aufeinanderfolgend von ihren Proteinen befreit werden.

[0045] Die Proteine an den Umkehrphasen werden wiederum gewaschen, dieses Mal mit einer Flüssigkeit, die die Proteine nicht von den Umkehrphasen eluiert. Das kann beispielsweise mit angesäuertem Wasser geschehen. Auch hier können Belegungen der Wände der Mikrogefäße mit Umkehrphasen oder Umkehrphasenkügelchen mit magnetischem Kern verwendet werden, das Waschen kann mit Hilfe von Magneten oder mit Hilfe besonderer Pipettenspitzen abgekürzt werden. Die Magnete helfen auch dabei, die Partikel an der Wand der Wells festzuhalten, um die Waschflüssigkeit aus den Wells der Mikrotiterplatten restlos zu entfernen, ohne die Partikel mit den gebundenen Proteinen mitzunehmen.

[0046] Der Trennvorgang mit Umkehrphasen besteht aus einem partiellen Auslösen der Proteine mit einer wässrigen Lösung eines organischen Lösemittels, wobei für die verschiedenen Fraktionen der Anteil an organischem Lösemittel stufenweise steigt. Auch hier kann ein mehr-

faches Auswaschen mit gleicher Konzentration vorgenommen werden, um die Trennschärfe zu erhöhen. Die Lösungen der Proteine können beispielsweise direkt auf MALDI-Probenträgerplatten aufgebracht werden, die bereits mit einer Dünnschicht von α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure als Matrixsubstanz belegt sind. Diese Schicht bindet die Proteine affin, die Lösung kann nach kurzer Einwirkungszeit wieder abgesaugt werden.

[0047] Die Trennung mit teilselektiven Affinitätsphasen erfolgt etwas anders als bei den vorgehend beschrieben Phasen. Hier wird jede Fraktion der vorausgehenden Trennungen jeweils nacheinander den verschiedenen Affinitätsphasen zugeführt, wobei diese sich beispielsweise ebenfalls als Wandbelegungen in Mikrogefäßen befinden können. Jede dieser Affinitätsphasen entzieht der Fraktion bestimmte Proteine und bindet diese. Nachdem die Lösung einer Reihe von beispielsweise sieben verschiedenen Affinitätsphasen nacheinander zugeführt wurde, kann die restliche Lösung immer noch Proteine enthalten, die bisher von keiner Affinitätsphase gebunden wurden. Dieser Rest bildet dann eine achte Fraktion, die beispielsweise einer breitbandigen Umkehrphase zugeführt wird, um die Proteine ebenfalls oberflächengebunden vorliegen zu haben.

[0048] Aus diesen teilselektiven Affinitätsphasen können die Proteine durch entsprechende Lösemittel entweder komplett ausgelöst werden, oder aber wiederum fraktionierend durch steigende Anteile an organischen Lösemitteln. Im letzteren Fall erwirken die teilselektiven Affinitätsphasen eine Trennung nach zwei Dimensionen.

[0049] Die Mikrotiterplatten können vorgefertigt und versiegelt alle verwendeten Partikelsuspensionen, Wandbelegungen, Waschflüssigkeiten, Lösungen mit eingestellten Salzgehalten, Enzyme und Pufferlösungen zur Aktivierung der Enzyme enthalten. Die Mikrotiterplatten können, gegebenenfalls zusammen mit anderen Verbrauchsmaterialien wie beispielsweise den besonders geformten Pipettenspitzen, in gebrauchsfertigen Verbrauchspackungen in den Handel kommen.

[0050] Das erfindungsgemäße Verfahren kann vom Fachmann unter Kenntnis der Grundsätze der Erfindung in vielfältiger Weise variiert werden. Die Erfindung ist daher nicht auf die oben angeführten Beispiele begrenzt. So können insbesondere andere Arten der Trennung (nach anderen Dimensionen) verwendet, es können andere Arten des Verdaus oder der Spaltung angewandt, oder die Trennungen können auf kleinen Durchlaufsäulen, die mit schwammartigen Phasen gefüllt sind, durchgeführt werden.

Ansprüche

1. Verfahren zur mehrdimensionalen Auftrennung eines Biosubstanzgemischs für eine massenspektrometrische Analyse,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Trenneffekte bei der fraktionierenden Bindung von Biosubstanzen aus Lösungen an festen Oberflächen oder bei der fraktionierenden Lösung von Biosubstanzen aus oberflächlich gebundenen Biosubstanzgemischen durch besonders eingestellte Lösemittelgemische für die Trennung in mehrere diskrete Fraktionen eingesetzt werden, und
dass zwei oder mehr solcher Trenngenerationen mit verschiedenartigen Trenndimensionen für die Trennung der jeweiligen Fraktionen in jeweils mehrere diskrete Unterfraktionen hintereinandergeschaltet werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Biosubstanzgemisch um ein Gemisch von Proteinen und/oder Proteinkonjugaten handelt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die oberflächliche Bindung an Oberflächenbeschichtungen mit flüssig-chromatographischen Phasen oder substanz-affinen Schichten durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberflächenbindungen der Biosubstanzen in Mikrotiterplatten vorgenommen werden, deren Mikrogefäße auf ihren Innenoberflächen substanzbindende Beschichtungen tragen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberflächenbindungen der Biosubstanzen in Mikrotiterplatten vorgenommen werden, in deren Mikrogefäßen sich Suspensionen mit oberflächenbeschichteten Partikelchen befinden.

6. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Partikelchen um magnetisierbare Kügelchen handelt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberflächenbindungen der Biosubstanzen auf flachen Trägern vorgenommen werden, auf deren hydrophober Oberfläche sich fleckenweise Belegungen mit substanzbindenen Schichten befinden.

8. Verfahren nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass vor der massenspektrometrischen Analyse ein enzymatischer Verdau der getrennten Biosubstanzen durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auftrennung des Biosubstanzgemischs durch eine Size-Exclusion-Chromatographie vorgeschaltet ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Size-Exclusion-Chromatographie auf einer Mikrosäule abläuft.

11. Verfahren nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die substanztrennenden Verfahrensschritte auf einem Pipettierroboter ablaufen.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass auch die Präparationen der massenspektrometrisch zu untersuchenden Proben aus den getrennten Fraktionen auf MALDI-Probenträgerplatten ebenfalls auf dem Pipettierroboter ablaufen.

13. Mikrotiterplatte, dadurch gekennzeichnet, dass ihre Mikrogefäße mit einer durchstechbaren Folie verschlossen sind und dass in ihren Gefäßen die benötigten Wandbelegungen mit bindefähigen Materialien oder gegebenenfalls die Suspensionen der Partikelchen enthalten sind.

14. Mikrotiterplatte nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass auch die Extraktionslösungen mit eingestellten Salzgehalten, die Waschflüssigkeiten, gegebenenfalls die Enzyme und die Pufferlösungen zur Aktivierung der Enzyme in den Mikrogefäßen vorgefertigt vorhanden sind.

15. Mikrotiterplatte nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass auch die Matrixsubstanz für die Probenpräparation für eine Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption enthalten ist.

16. Verbrauchspackung für die Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Mikrotiterplaten nach Anspruch 13 bis 15 enthält.

17. Verbrauchspackung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie auch austauschbare Pipettenspitzen in einer an die Mikrogefäße angepassten Form enthält.

18. Pipettenspitze für einen Pipettierroboter, dadurch gekennzeichnet, dass ihre Form an die Form der Mikrogefäße einer Mikrotiterplatte so angepasst ist, dass nach dem Einführen in das Mikrogefäß zwischen Gefäßwand und Pipettenspitze ein enger, flächiger Spalt entsteht.

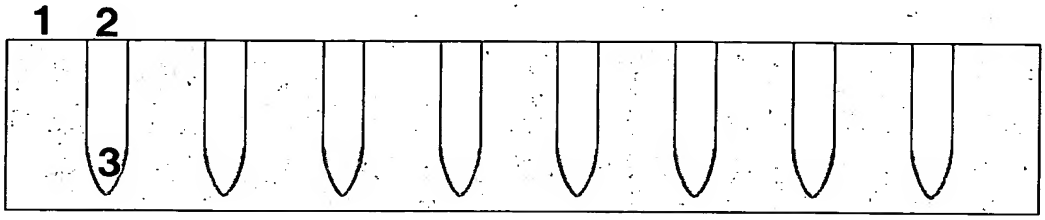


Abbildung 1

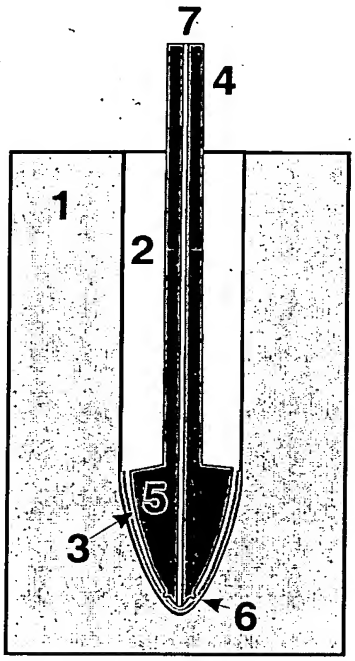


Abbildung 2